

## Caracterización de huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp *nutalliae*) del Estado de México mediante microsatélites

### Characterization of huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp *nutalliae*) of Estado Mexico trough microsatellite markers

Andrés Xingú-López<sup>1</sup>, Artemio Balbuena-Melgarejo<sup>1</sup>, Antonio Laguna-Cerda<sup>1</sup>, Lourdes G. Iglesias-Andréu<sup>2</sup>, Verónica Olivares-Cruz<sup>3</sup> y Eulogio de la Cruz-Torres<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la UAEMEX, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México. <sup>2</sup>Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, <sup>3</sup>Tecnológico de Estudios Superiores, Villa Guerrero, Estado de México, <sup>4</sup>Departamento de Biología. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Estado de México.

\*Autor de correspondencia (eulogio.delacruz@inin.gob.mx) recibido: 23 marzo 2018 aceptado 7 junio 2018.

Artículo Científico

## RESUMEN

*Chenopodium berlandieri* ssp *nutalliae* es un cultivo de traspatio, con alto valor nutricional para la población de bajos ingresos. Este estudio se realizó en municipios del Estado de México, a través de colectas que exhiben variabilidad morfológica y pueden presentar también variabilidad genética detectable mediante el uso de marcadores moleculares del tipo microsatélites (SSR) desarrollados para *Chenopodium*, ya que su cultivo tradicional y el intercambio entre comunidades ha permitido la conservación del valioso germoplasma de generación en generación. Para la extracción de ADN se utilizó la técnica descrita por Dellaporta en 1993; para el estudio de poblaciones de huauzontle, se usaron 21 iniciadores desarrollados por Mason *et al.* (2005), los cuales amplifican regiones del ADN

conocidas como microsatélites (secuencias repetitivas simples o SSR) y 38 colectas de huauzontle, provenientes de Estado de México, que generaron un total de 80 loci de los cuales 79 fueron polimórficos. El análisis de marcadores moleculares SSR agrupó a las colectas de huauzontles en seis grupos a una distancia de 0.619. Los resultados mostraron que los marcadores SSR, son una herramienta útil para la discriminación rigurosa de genotipos de huauzontle. Estas relaciones genéticas entre los híbridos fueron confirmadas con el análisis de coordenadas principales.

**Palabras clave:** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), biología molecular, diversidad genética, iniciadores, dendrograma.

## ABSTRACT

*Chenopodium berlandieri* ssp *nutalliae* is a crop backyard, with high nutritional value for low-income population. This study was conducted in municipalities of Mexico state, through collections that exhibit morphological variability and may also have detectable genetic variability using molecular markers of the microsatellite type (SSR) developed for *Chenopodium*; because its traditional crop and exchange among communities has allowed the conservation of valuable germplasm from generation to generation. The technique described by Dellaporta in 1993 was used for DNA extraction; to study huauzontle populations, they were used 21 initiators developed by Mason *et al.* (2005), which amplify regions of DNA known as microsatellites (simple

repetitive sequences or SSR) and 38 collections of huauzontle, from the Mexico state, which generated a total of 80 loci of which 79 were polymorphic. Molecular markers analysis to SSR collections grouped into six huauzontle groups at a distance of 0,619. The results showed that SSR markers are a useful tool for discrimination of genotypes rigorous huauzontle. These genetic relationships among hybrids were confirmed with the principal coordinate analysis.

**Keywords:** Polymerase chain reaction (PCR), molecular biology, genetic diversity, initiators, dendrogram.

## INTRODUCCIÓN

Los pseudocereales (*Chenopodium* y *Amaranthus*) se denominan así porque sus semillas, como las de los cereales, son harinosas y aptas para la panificación, pero pertenecen a las dicotiledóneas (Mateo, 2005). Uno de los pseudocereales de gran importancia es el huauzontle (*Chenopodium berlandieri* ssp. *nuttalliae*), especie que México aportó al mundo y que constituyó, junto con el maíz (*Zea mays*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*), el chile (*capsicum annum*) y la calabaza (*cucurbita pepo*), la base de la alimentación de las culturas prehispánicas de Mesoamérica (Hunziker, 1952). En el valle de Toluca el huauzontle se cultiva asociado con calabaza, maíz y cempasúchil (*Tagetes erecta*). El huauzontle se distribuye ampliamente en Norteamérica y Centroamérica, los nombres comunes más popularmente utilizados en diversas comunidades son: huauhtli, huautli, guauhtli, guautli, guahuquizliltli, guatzontli, todos ellos derivados del Náhuatl (Mújica *et al.*, 2001). El huauzontle es un quelite, que en el español de México significa hierba comestible cuando aún son tiernas y de uso común en el centro del país, (Carrillo and Mark. 1994).

La contribución de las semillas de huauzontle como fuente proteica ha sido evidenciada por De La Cruz *et al.* (2006) destacando su valor proteico (17,8 %), así como su contenido de ácidos grasos esenciales, considerándolo como alternativa para contribuir a reducir la desnutrición en áreas rurales. La producción del huauzontle, se realiza en traspatios y la tradición de su cultivo se hereda de generación en generación, sin embargo, en los últimos años, su cultivo ha declinado debido al poco uso, a la sustitución de cultivos y, a que las nuevas generaciones abandonan el campo, buscando en las ciudades mejores alternativas de desarrollo.

Ante la crisis que afronta la agricultura, es necesario e importante rescatar y aprovechar alternativas de cultivos que presenten un gran potencial, por su valor nutritivo y rusticidad, facilitando la práctica de la agricultura sustentable, que permita generar ingresos adicionales a los productores que habitan en zonas con condiciones agrícolas marginales.

En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer la variabilidad genética en las poblaciones naturales de manera indirecta, como son los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de

detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). Los marcadores moleculares se han utilizado y se utilizan en la mejora genética de plantas como estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas o híbridos; identificación y distinción de variedades, líneas puras e híbridos; establecimiento de relaciones de parentesco o "pedigrí" entre líneas o variedades para realizar estudios genéticos y la localización e identificación de genes cualitativos y cuantitativos (Moreno, 1993); Fairbanks *et al.* (1993) fueron los primeros en usar los marcadores moleculares en especies del género *Chenopodium* y particularmente en quinua. Ellos usaron iniciadores de secuencias de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs) para detectar polimorfismos entre colectas de esta especie. Rúas *et al.* (1999) usaron RAPDs para investigar la interrelación entre 19 especies de *Chenopodium* y encontraron que las colectas se agruparon de acuerdo a su clasificación por especies. Mason *et al.* (2005) desarrollaron marcadores de microsatélites en quinua mediante secuenciación de 1276 clones de bibliotecas genómicas enriquecidas de ADN repetitivo CA, ATT y ATG. Encontraron que de 397 microsatélites, 208 fueron polimórficos en un panel de 31 colectas de quinua. Además los marcadores fueron evaluados en tres diferentes especies de *Chenopodium* (*C. pallidicaule*, *C. giganteum*, y *C. berlandieri* ssp. *nuttalliae*), 67 % de los microsatélites amplificaron en todas las especies, mientras que 99.5 % amplificaron en *C. berlandieri* ssp. *nuttalliae*. Además de los microsatélites, se han desarrollado para la quinua marcadores SNP (polimorfismo de nucleótido único). Coles *et al.* (2005), obtuvieron 425 marcadores de secuencia expresada (ESTs); de estos marcadores, se encontró que 349 tenían homología con genes codificadores de proteínas de otras plantas, 51 marcadores se identificaron como SNPs, de los cuales 38 fueron cambios en un solo nucleótido y 13 fueron cambios de inserción/delección. Además 81 marcadores SNPs se obtuvieron cuando la quinua se comparó con *C. berlandieri* ssp. *nuttalliae*.

En el presente trabajo se caracterizan molecularmente 38 colectas de huauzontle, utilizando 21 iniciadores para microsatélites desarrollados específicamente para *Chenopodium* por Mason *et al.* (2005), con el objetivo de determinar

la variabilidad genética en el germoplasma de huauzontle (*Chenopodium, berlandieri* ssp

*nuttalliae*) colectado en zonas productoras del estado de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras recolectadas presentan características similares en relación al clima y tipo de suelo. La población de San Francisco Tlalcalcalpan, municipio de Almoloya de Juárez, y los municipios de Toluca, Atlacomulco, Tenango del Aire y Xonacatlan presentan un clima, Cb (w2) (w) (i') (g), (templado sub húmedos con lluvias en verano), con temperatura media anual que oscila entre 13.4 y 13.8 °C y precipitación media anual varía de 800 a 1,200 milímetros, todos con suelo tipo vertisol. La Comunidad, municipio de Temascaltepec presenta clima templado subhúmedo, con temperatura media anual entre los 18 y 22 °C y una precipitación pluvial anual de 800 a los 1,600 milímetros.

Se utilizaron 38 colectas diferentes de huauzontle; el muestreo fue dirigido, el cual consistió en seleccionar las unidades elementales de la población según las características deseables que diferenciaban una de otra, y se colectó material vegetativo (hojas sanas y en buenas condiciones) representativo de la diversidad genética existente en las áreas exploradas. La técnica empleada para la obtención de ADN fue la descrita por Dellaporta (1983), la cual

utiliza 2 g de muestra de hojas expandidas y en buenas condiciones, utilizando Buffer de extracción para ADN (100 mM Trizma base, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1 % SDS, 10 mM fenantrolina, 10 mM 2-Mercaptoetanol, pH 8.0).

La pureza y concentración del ADN se determinó por métodos espectrofotométricos. Para determinar la pureza de las muestras de ADN se tomaron muestras alícuotas de 4 µL de ADN y se disolvieron en 2000 µL de agua destilada estéril. Con los cocientes obtenidos de las lecturas (260/280), se estimó la pureza de los ácidos nucleicos en cada muestra. Los valores entre 1.8 y 2.0 se tomaron como óptimos. El grado de integridad del ADN se estimó por separación electroforética de ADN en geles de 1.5 % de agarosa, teñidos con 5 µL de bromuro de etidio. La electroforesis fue realizada a 100 voltios y 50 amperios, durante 50 minutos en amortiguador 0.5X TBE. Se usaron los iniciadores desarrollados por Mason *et al.* (2005), los cuales amplifican regiones del ADN microsátélites (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Secuencias de iniciadores usados en las muestras de huauzontle, para identificación de microsátélites.

Iniciador	Secuencia en avance	Secuencia en reversa
QCA066	5'-AGA GTT CTT ACA TAA GGG AAG AGT-3'	3'-TTT CCT TTG GTA GTT TCT TGT T-5'
QCA065	5'-CCA TGC AAG GGA ACA TAT TG-3'	3'-AAG TTC GTT GGC TTG CTG TA-5'
QCA063	5'-GCA GCA TCA CAG AGC AGA AA-3'	3'-GGT GTA GAT TGG GAG CCT GA-5'
QCA058	5'-CTC GAC CAG CAG GGT CTG-3'	3'-CTA GCT AGG CGT TGC CTG AC-5'
QCA057	5'-TGC AAG GAA ACC ATC TTT GG-3'	3'-TGC CTC ACA GTC ACA CCT ACA-5'
QCA056	5'-TTG GAA GAG CTC CAC AAG GT-3'	3'-CCT CTG AAT AGG ATA CCC TTC TGT-5'
QCA051	5'-TGT TTC GGG TAG AAA CAC CAA-3'	3'-TGC AAT TCA ATG CCC ACA TA-5'
QCA048	5'-ACA ATA CAT ACA TAA CCC AAT ATT CAA-3'	3'-TGG AAA TGT CAC TAT GAT TGG A-5'
QCA046	5'-GCA GGT AAA TCA ACC CTT GC-3'	3'-TGC ATG ATA AAC TAA GCA GAC GA-5'
QCA037	5'-CCG TTC TTC CAG ACC AAT TC-3'	3'-TCA TGA GCC ACT TCA ACG-5'
QCA033	5'-CAG GGC AGT CCA CCT CTC TA-3'	3'-ACC TTC TAG TCC TAT GTT CTT GTA TGG-5'
QCA030	5'-TCA TTG GTT AGA TGG TGG AAT G-3'	3'-CCC TCT AGT GCA TAG GAG TTT CTG-5'
QCA028	5'-TGC TCA CCC TAG CAT TTA TAC ACT-3'	3'-ATG AGA CGG AGG GAG CAC TA-5'
QCA026	5'-TCC CCA TAC AGC ACC ACC TC-3'	3'-TGC AAG CAT ACA TAA GAC AGT CA-5'
QCA019	5'-TTT CAT CAC TCG ACC GTA TAG C-3'	3'-AGG GTG ACT GTT ACA CCC AAA-5'
QCA005	5'-GTG GTT CAT GGC TGA TCC TT-3'	3'-CTT GCC ATC AGG GCA TAT CT-5'
QCA0005	5'-TGA GGA CAC ACA CAC ACA CAC-3'	3'-GGG ACC GTT TAA TTC AGC AA-5'
QATG016	5'-CCA CAC TCA TCT CAA CCA TCC-3'	3'-GCG ATC CGG TAC ATC ATT TC-5'
QATG012	5'-GGC AAA CAC ATG GAT CTC AA-3'	3'-CAA ACA GCG AAG AGG TTT CC-5'
QATG009	5'-GAC TAA TGA ACG GAT GGA AGC-3'	3'-CCT CCC ACA TAA CCT TCC TCT-5'
QATG019	5'-CCA AAC AAA GAC AAT AAG GAA ACC-3'	3'-CGA GGT TGA AGG AGA TTC CA-5'

Las amplificaciones por PCR se efectuaron con mezclas de reacción que contenían: 3.4 µL de agua; 1.3 µL de cresolred; 1.3 µL de buffer de reacción 10x (15 mM), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (1.3 µL), 1.3 µL de dNTPS (10 mM), 0.3 unidades taq polimerasa (0.1 µL), 20 µM de iniciador (1.3 µL) y 60 ng de ADN geonómico; para tener un total de 14 µL de mezcla de reacción. La amplificación se efectuó en un termociclador Perkin Elmer Cetus, programado con un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 1 min, seguido de ciclos de desnaturalización a 94 °C por un min, alineamiento a 64 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por un minuto, repetidos 18 veces disminuyendo la temperatura de alineamiento 0.5 °C cada ciclo; seguido de 29 ciclos conformados por desnaturalización a 94 °C por 1 min alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min; posteriormente se dio un periodo de extensión final a 72 °C por 10 min y un almacenamiento a 4 °C. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 % peso/volumen, teñidos con 5 µl de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100 voltios y 50 amperios, durante 50 min, utilizando una fuente de poder PS 250-1 (Sigma) y una cámara de

electroforesis horizontal. En los pozos del gel, a las orillas se depositaron 5 µl de ADN ladder (100 pb) como referencia de pesos moleculares, en los siguientes se depositaron las muestras que contenían un volumen de 14 µl de la muestra amplificada. Para la separación de los fragmentos por electroforesis se utilizó el amortiguador TBE 0.5X, para posteriormente observarlos y capturarlos digitalmente en un transiluminador BIO-RAD modelo Universal Hood II.

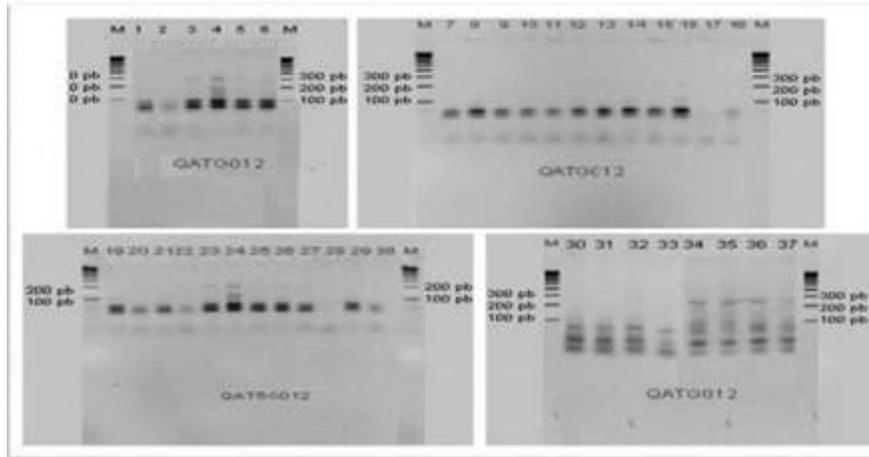
Los tamaños de fragmentos SSR se calcularon a partir de una curva estándar basada en el tamaño conocido de fragmentos de ADN de 100 bp (Biogenica). Los loci se registraron como presentes (1) y ausentes (0) y se estableció una matriz de doble entrada (muestra por marcador). Las bandas difusas no se consideraron. Los datos se analizaron, basándose en los datos de similitud de la matriz, usando el coeficiente de similitud Jaccard y aplicando el método de análisis de conglomerados de pares agrupados no ponderados, con promedio aritmético (UPGMA) usando el programa de cómputo NTSYS-PC versión 1.8. Así mismo se realizó un análisis de componentes principales mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las amplificaciones se observó un marcado polimorfismo; esto es posible ya que en los iniciadores en los que se observó el mayor número de bandas, resolución y reproducibilidad, existió un mayor porcentaje de homología de sus secuencias con las ADN blanco, donde se inició la polimerización y que la temperatura de alineamiento utilizada favoreció la estabilidad en el alineamiento de estos iniciadores con

el ADN. También es posible que otras características de los iniciadores influyeron, ya que la temperatura del alineamiento para las reacciones de PCR se define por la longitud, contenido de GC y orden de los nucleótidos en el iniciador (Hoelzel and Green, 1992; Guevara-García *et al.*, 1997).

Se reprodujeron 80 loci de SSR, observándose un marcado polimorfismo como se observa en la Figura 1.



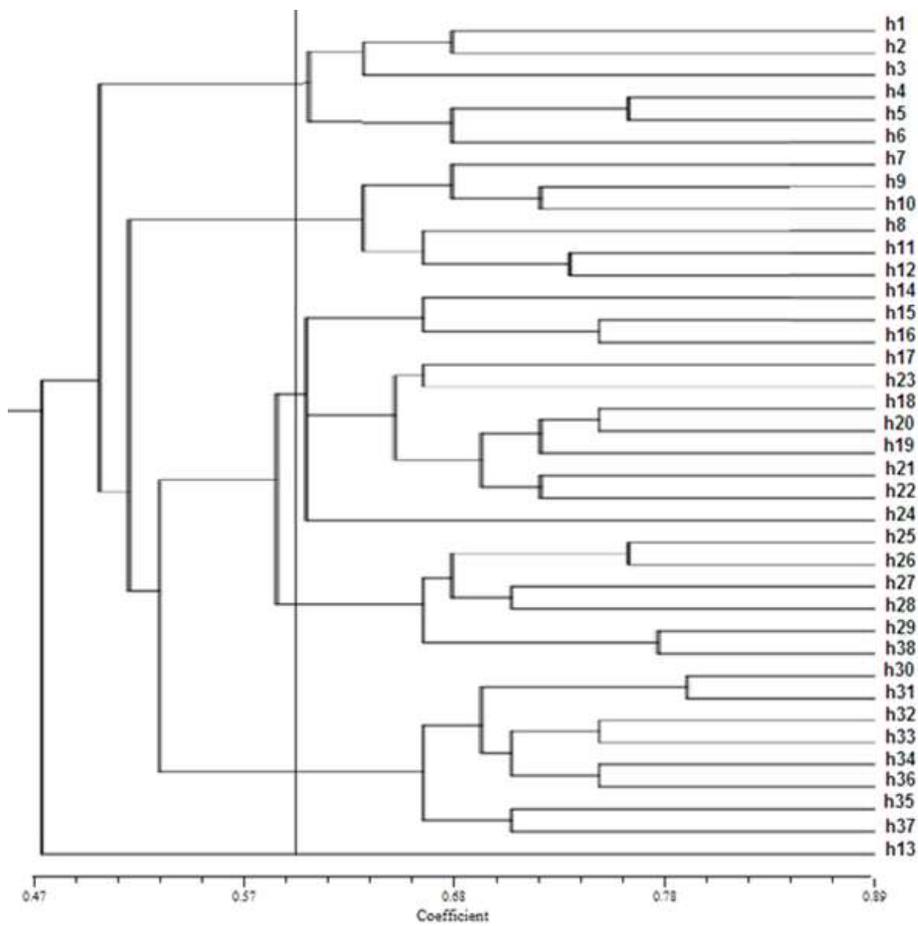
**Figura1.** Loci de microsatélites con el iniciador QATG012 entre las colectas

El dendrograma divide a las colectas estudiadas en 6 grupos. Las colectas incluidas en el primer conglomerado son: h1, h2, h3, h4, h5 y h6; colectadas en los municipios de Lerma, Xonacatlán y Atlacomulco. El grupo 2 está constituido por seis colectas (h7, h9, h10, h8, h11 y h12) colectadas en los municipios de Villa Cuauhtémoc, Xonacatlán y Toluca. El tercer grupo se conforma por las colectas h14, h15, h16, h17, h23, h18, h20, h19, h21, h22 y h24; muestras colectadas en el municipio de Toluca. El cuarto conglomerado incluye a las colectas h25, h26, h27, h28, h29 y h38, colectadas en diferentes localidades del municipio de Toluca y en el municipio de Temascaltepec. El quinto conglomerado incluye a las colectas h30, h31, h32, h33, h34, h36, h35 y h37, colectadas en diferentes localidades del municipio de Toluca, quedando completamente separada la colecta h13 que no exhibió ninguna afinidad con el resto de las colectas, la cual fue colectada en el municipio de Almoloya de Juárez (figura 2). El total de las colectas mostraron una homología máxima de 0,887 entre las colectas h30 y h31, correspondiendo a colectas de la misma localidad y una homología mínima de 0.309 entre las colectas h17 y h3 colectas de diferentes localidades. La colecta h13 no se integró en ningún grupo, presentando la mayor similitud de 0.642 con h15.

#### Análisis de componentes principales (ACP)

En el ACP se encontró que con los primeros 10 componentes principales (CP) se explicó el 70 % de la variación de las colectas de huauzontle (Cuadro 2). Los loci que contribuyeron a la variación en los primeros tres componentes principales fueron para el CP1: QCA066-75, QCA066-50, QCA065-75, QCA065-50, QCA058-200, QCA046-200, QCA033-150, QCA030-80, QCA005-200, QCA005-150, QATG016-250, QATG012-200 y QATGO12-100; para el CP2:

QCA058-50, QCA057-180, QCA056-50, QCA037-200, QCA037-80, QCA033-250, QCA030-200, QCA019-200, QCA005-50; para el CP3: QCA063-50, QCA048-200, QCA037-150, QCA028-200, QCA028-100, QCA026-180, QCA019-80, QCA0005-50, QATG019-200, QATC012-50 y QATGO12-30 (Cuadro 2).



**Figura 2.** Dendrograma de 38 colectas de huauzontle a partir de SSR basado en la distancia genética

**Cuadro 2.** valores característicos y variación explicada con los primeros 10 CP

CP	Eigen valor	Diferencia	Proporción	Acumulada
1	11.66	1.48	0.15	0.15
2	10.18	3.50	0.13	0.29
3	6.68	1.49	0.09	0.38
4	5.19	0.96	0.07	0.44
5	4.23	0.30	0.06	0.50
6	3.93	0.94	0.05	0.55
7	2.99	0.09	0.04	0.59
8	2.90	0.23	0.04	0.63
9	2.67	0.25	0.04	0.66
10	2.42	0.22	0.03	0.70

El ACP representa gráficamente las relaciones entre colectas de diferente origen geográfico e igualmente se muestra la estrecha relación entre colectas, el grupo uno se compone por las colectas H10, H9, H7, H11, H12 H8 y H13, las cuales provienen de diferente municipio del valle de Toluca; el grupo 2 constituido por H1, H2, H3, H4, H5 Y H6, provenientes de diferentes

localidades del valle Toluca-Atacomulco; el grupo 3 concentra la mayor cantidad de colectas (H38, H15, H29, H25, H26, H27, H19, H20, H18, H16, H21, H23, H24, H28, H14, H17 y H22, provenientes del municipio de Toluca y una de Temascaltepec; mientras que el grupo 4 se compone de las colectas H31, H36, H30, H32, H34, H35, H33 y H37, colectas de Toluca.

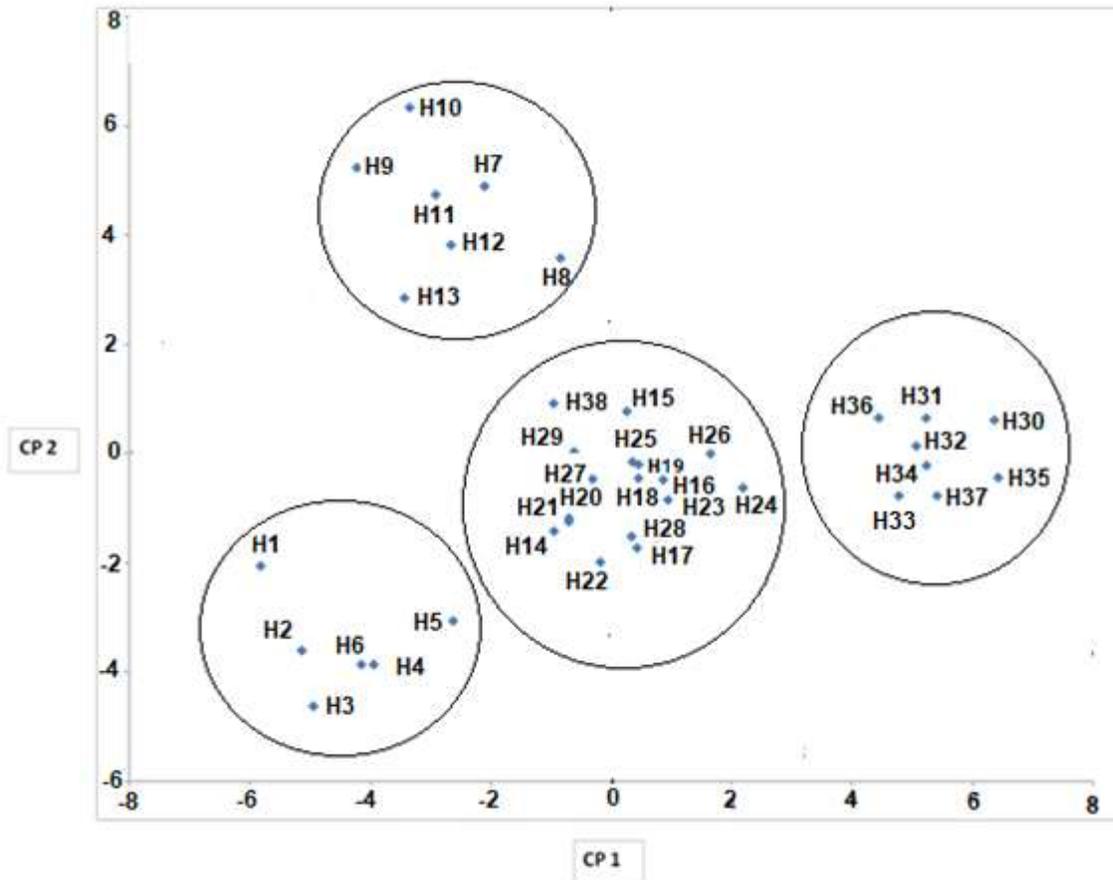


Figura 3. Representación de colectas de huauzontle frente a los dos primeros componentes principales

### CONCLUSIONES

Se definieron seis grupos con los genotipos de huauzontle del estado de México, de acuerdo con las similitudes y las diferencias identificadas en las secuencias repetitivas simples (SSR) de las colectas. La mayor diversidad observada a nivel molecular encontrada en este estudio podría explicarse por un cruzamiento en los campos de cultivo de huauzontle con poblaciones arvenses de *Chenopodium*. Así mismo, este proceso natural se combina con el intercambio de semillas ancestrales, la selección y los factores edafoclimáticos y de fotoperiodo.

Las colectas se agruparon principalmente de acuerdo a las variables morfológicas: porte de planta, tamaño de hoja, tamaño y forma de panoja, presencia o ausencia de estrías, color de hoja y color de tallo. La procedencia de estas colectas no fue un factor determinante en el análisis de conglomerados.

El análisis de componentes principales nos permite determinar las relaciones entre colectas de huauzontle del mismo o diferente origen geográfico. El origen de estas colectas no fue un factor determinante en el análisis de conglomerados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carrillo A y Mark E (1994). Anatomía de la semilla de *Chenopodium berlandieri* ssp. *nuttalliae* (Chenopodiaceae) "huauzontle". Boletín de la Sociedad Botánica de México 54:17-34.
- Coles ND; Coleman CE; Christense SA; Jellen EN; Stevens MR; Bonifacio A; Rojas-Beltrán JA; Fairbanks DJ; Maughan PJ (2005). Development and use of an expressed sequenced tag library in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) for the discovery of single nucleotide polymorphisms. Plant Science 169:439-447.
- De La Cruz E; García JM; Martínez NC (2006). Análisis Físico y bromatológico de razas locales de pseudocereales. XXI Congreso Nacional de Fitogenética. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. Septiembre 2006. Memorias en disco compacto.
- Dellaporta S and Hicks J (1983). A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-20.
- Fairbanks DJ; Waldrigues DF; Ruas C; Ruas RM; Maughan PJ; Robison LR; Andersen WR; Riede CR; Panley CS; Caetano LG; Arantes OMN; Fungaro MH; Vidotto MC; Jankevicius SE (1993). Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and RAPD markers. Brazil J of Genetics 16:11-33.
- Hoelzel AR and Green A (1992). Analysis of population level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Hoelzel AR, (Ed.). Molecular genetic analysis of populations: a practical approach Oxford: Oxford University. Press. 159-187.
- Hunziker TA (1952). Los pseudocereales de la agricultura indígena de América. ACME Agency Soco Resp. Ltd. 101 p.
- Guevara-García AC; San Roman A; Arroyo ME; Cortés M; Gutiérrez-Nava; León P (2005). Characterization of the Arabidopsis *clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4Phosphate Pathway. The Plant Cell. 17:628-643.
- Mateo JM (2005). Prontuario de agricultura, Cultivos agrícolas. Mundi prensa. México. 146-148.
- Mason SL; Stevens MR; Jellen EN; Bonifacio A; Fairbanks DJ; McCarty RR; Rasmussen AG; Maughan PJ (2005). "Development and Use of Microsatellite Markers for Germplasm Characterization in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)." Crop Science. 4:1203-1684.
- Moreno GJ (1993) Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. Genetics 135:223-231.
- Mújica SA; Izquierdo J; Marethee JP (2001). Quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd) ancestros, cultivos andinos, alimentos del presente y futuro. Santiago de Chile. 5-19.
- Simpson J (1997). Amplified fragment length polymorphisms. Bol. Soc. Bot. Méx. 60:73-76.
- Rúas PM; Bonifacio A; Rúas CF; Fairbanks DJ; Anderson WR (1999). Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L. by Random Amplified Polymorphic DNA Fragments (RAPD). Euphytica 105:25-32.